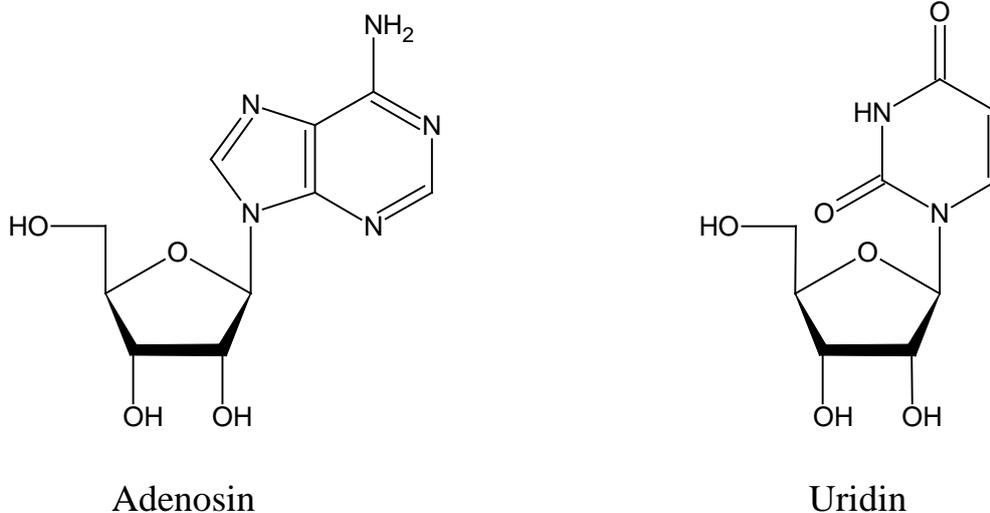


## Ribonucleoside in Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Kamelmilch

Dierk Martin

Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, Max Rubner-Institut (MRI), Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel

Ribonucleoside zählen zu den minoren Milchinhaltstoffen, die mit etwa 0,1 Gewichtsprozenten in der Kuhmilch vorliegen. Neben den Ribonucleosiden gehören auch Ribonucleotide und Vitamine sowie eine Vielzahl noch unbekannter organischer Substanzen zu diesen Minorkomponenten [1]. Ribonucleoside gelangen als Stoffwechselprodukte des zellulären Ribonucleinsäuren- und Ribonucleotidstoffwechsels in die Milch [2]. Strukturell betrachtet sind Ribonucleoside Purin- und Pyrimidinverbindungen, die N-glykosidisch an  $\beta$ -D-Ribofuranose gebunden sind [3]. Ribonucleotide sind ortho-Phosphorsäureester von Ribonucleosiden.



**Abb. 1:** Struktur von Ribonucleosiden am Beispiel Adenosin (Purin-Ribonucleosid) und Uridin (Pyrimidin-Ribonucleosid).

Die **Ribonucleosid-Bestimmung** in Milch und Milchprodukten erfolgt mit Hilfe der Zwei-Säulen-HPLC-Technik: Das angewendete Analysensystem besteht aus zwei voneinander unabhängigen chromatographischen Untereinheiten, die durch ein automatisches Hochdruck-6-Wege-Ventil miteinander verbunden bzw. voneinander getrennt werden können. Hierbei werden die Ribonucleoside in einer mit chemisch modifiziertem Aminophenylboronsäure-Gel gefüllten Vorsäule

kovalent aus der entsprechenden Matrix gebunden. Beim Transferschritt werden die Milchribonucleoside in die analytische Säule eluiert und hier an einer Umkehrphase (RP-18-Phase) aufgetrennt. Die Detektion erfolgt mit einem Diodenarray-Detektor bei einer Messwellenlänge von 260 nm [4]. Bei Anwendung eines automatischen Probengebers („auto-sampler“) ist ein 24 stdg. Betrieb möglich. Bei üblichen Ribonucleosidbestimmungen wird ein Standard verwendet, der folgende Ribonucleoside enthält: Cytidin (Cyd), Uridin (Urd), Guanosin (Guo), Inosin (Ino), Adenosin (Ado), 1-Methyladenosin (m1Ado), N6-Carbamoylthreonyladenosin (t6Ado), N6-Methyladenosin (m6Ado), N6-Dimethyladenosin (m6,2Ado).

Das im MRI etablierte Analysenverfahren wurde in der Vergangenheit für die Ribonucleosid-Bestimmung in Milch und Milchprodukten sowie anderen biologischen Matrices angewendet. So wurde in **wärmebehandelten Milchproben Ribonucleosid-Gehaltsveränderungen** bestimmt und die prozentualen Gehaltsveränderungen der einzelnen Ribonucleoside z. B. in thermisierten bzw. dauererhitzten Milchproben berechnet: Die größten Gehaltsveränderungen gegenüber der eingesetzten Rohmilch wurden, mit Ausnahme von Urd, in den unter Bedingungen der Dauererhitzung hergestellten Proben beobachtet [5]. Im Temperaturbereich der Kurzzeiterhitzung wurden im direkten Vergleich wesentlich geringere Gehaltsveränderungen bestimmt als bei 62°C Prozesstemperatur [5]. Die beobachteten Gehaltsveränderungen sind durch Enzym-katalysierte Reaktionen erklärbar, so z. B. durch die **Adenosin-Desaminase** (ADA, EC 3.5.4.4), die spezifisch Ado oxidativ zu Ino desaminiert. Im Institut wurde daher ein Verfahren zur ADA-Aktivitätsbestimmung in Milch entwickelt, bei dem durch Quantifizierung des enzymatischen Produkts Ino die Enzymaktivität direkt bestimmt wird. Im Rahmen der Aktivitätsbestimmungen in wärmebehandelten Milchproben konnte gezeigt werden, dass ADA ein geeigneter Hitzeindikator zur Unterscheidung von kurzzeit- und hocherhitzter Milch ist [6-9]. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Ribonucleosid-Analytik zur Beschreibung der **Wärmebehandlung von Milch** ist die thermisch-induzierte Bildung von **N6-Methyladenosin (m6Ado)**: Die m6Ado-Bildung ist ein geeigneter chemischer Indikator zur Beschreibung der Wärmebelastung von Milchproben des oberen Hocherhitzungsbereiches bis zum praxisrelevanten Sterilbereich ist [5, 10].

Neben dem Einfluss der Temperatur ist auch der Einfluss des Parameters Druck von Interesse: So konnten **Ribonucleosid-Gehaltsveränderungen** bei der **Hochdruck-Behandlung von Milch** bestimmt werden, so wurden z. B. in Rohmilch bei Cyd, Urd und abgeschwächt auch bei Guo und Ado hochdruckbedingte Gehaltszunahmen beobachtet. Bei Ino hingegen wurden in den Normaldruckproben höhere Konzentrationen gefunden als in den Hochdruckbehandelten Proben. Die beobachteten hochdruckbedingten Ribonucleosid-

Freisetzungen konnten weitestgehend durch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase erklärt werden [11, 12].

Ein weiteres Beispiel für die praktische Anwendung von Ribonucleosiden in Milch ist die **Buttersortenzuordnung**: In den Buttersorten Süßrahm, mild gesäuert und Sauerrahm liegen unterschiedliche Gehalte an Ado und Urd, aber auch an Milch- und Citronensäure vor. Mit Hilfe der genannten Analyten berechnet man Buttersortenindices, mit denen eine Buttersortenbestimmung möglich ist [13]. Einfacher geht es mit Hilfe eines trainierten neuronalen Netzwerks, bei dem die Parameter Citronensäure-Konzentration und pH des Butterplasmas für eine Zuordnung ausreichen. Nur im Grenzbereich zwischen Sauerrahm und mild gesäuerter Butter kann die Eingabe von Ado- und Urd-Gehalten notwendig sein [14].

In einem MRI-internen Projekt wurde das beschriebene Ribonucleosid-Analysesystem auch für **Fisch- und Fleischproben** angewendet: Hierbei wurden u. a. **Forellen** untersucht. Das Ribonucleosid Ino lag in den untersuchten Proben mit Abstand mit der höchsten Konzentration vor (ca. 60 bis 160 mg/100 g). Bei den untersuchten **Fleischproben** (Schweinebacke) konnten auch nur unmodifizierte Ribonucleoside nachgewiesen werden. Auch hier liegt das Ino in der höchsten Konzentration vor (rd. 57 mg/100 g) vor. Im Projekt wurde gezeigt, dass in Fisch und Fleisch um etwa 2 Zehnerpotenzen höhere Gehalte an frei verfügbaren Ribonucleosiden vorliegen als in Kuhrohmlch [15].

Bei den Untersuchungen von **Rohmilchproben** von **Kuh, Schaf, Ziege und Kamel** wurden prinzipiell Sammelmilchproben (Morgen- und Abendgemelk) ohne kolostrale Proben untersucht. Die Proben wurden von der Versuchsstation Schaedtбек des MRI (Kuh, Rasse: Holstein Schwarz-Bunt), vom Institut für Ökologischen Landbau des Thünen-Instituts, Trenthorst (Schaf, Rasse: Ostfriesisches Milchschaaf; Ziege, Rasse: Bunte deutsche Edelziege) sowie von der Dubai Camel Dairy Farm (Kamel, Rasse: Camelus dromedarius) erhalten [16].

In Kuhrohmsammelmilch konnten die Ribonucleoside Cyd, Urd, Ino, Guo und Ado sowie die modifizierten Ribonucleoside m1Ado und t6Ado in unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt werden, wobei Urd mit rd. 14,7  $\mu\text{mol/l}$  in der höchsten Konzentration und m1Ado mit 0,4  $\mu\text{mol/l}$  in der geringsten Konzentration vorlag (Tab. 1) [16, 17].

Die Untersuchung von Schaf- und Ziegenmilchproben wurde aus organisatorischen Gründen im Rahmen zweier zeitlich unabhängiger Studien (1. und 2. Studie, siehe Tab. 2 und 3) durchgeführt. In Schafmilch konnten im Vergleich zur Kuhmilch wesentlich höhere Gehalte an freien Ribonucleosiden nachgewiesen werden. Auch in Schafmilch wurden die modifizierten Ribonucleoside m1Ado und t6Ado bestimmt. Zwischen der 1. und 2. Studie sind bei den einzelnen Ribonucleosiden geringfügige Unterschiede erkennbar [16] [Tab. 2]. Auch in Ziegenmilch wurden neben den unmodifizierten auch die modifizierten Ribonuc-

leoside m1Ado und t6Ado nachgewiesen. Im Vergleich zur Kuhmilch liegen auch in Ziegenmilch wesentlich größere Ribonucleosid-Gehalte vor (Tab. 3) [16].

Tab. 1: Ribonucleosid-Gehalte [ $\mu\text{mol/l}$ ] in Kuhmilch (Rohsammelmilch über die gesamte Laktationsperiode mit Ausnahme der ersten 3 Wochen post partum).

[ $\mu\text{mol/l}$ ]	Cyd	Urd	m1Ado	Ino	Guo	Ado	m6Ado	t6Ado	m6,2Ado
<b>Mittelwert</b>	<b>2.44</b>	<b>14.69</b>	<b>0.40</b>	<b>0.97</b>	<b>0.82</b>	<b>1.36</b>	<b>n. d.<sup>a</sup></b>	<b>0.71</b>	<b>n.d.</b>
Min – max (n= 12)	0.53- 10.76	3.63- 68.22	0.17- 1.58	0.01- 3.25	0.10- 2.22	0.06- 3.93	-	0.40- 3.40	-
VC [%] <sup>b</sup>	32	32	20	44	39	49	-	19	-

a: n. d. : Nicht detektierbar.

b: Variationskoeffizient zur Beschreibung der biologischen Schwankung.

Tab. 2: Ribonucleosid-Gehalte [ $\mu\text{mol/l}$ ] in Schafmilch (Sammelmilch, ohne Kolostralmilch).

[ $\mu\text{mol/l}$ ]	Cyd	Urd	m1Ado	Ino	Guo	Ado	m6Ado	t6Ado	m6,2Ado
1. Studie									
<b>Mittelwert</b>	<b>6.74</b>	<b>67.78</b>	<b>1.37</b>	<b>41.21</b>	<b>2.06</b>	<b>8.77</b>	<b>0.02<sup>a</sup></b>	<b>0.72</b>	<b>n. d.<sup>b</sup></b>
$\pm$ s.d.	<b>0.46</b>	<b>0.84</b>	<b>0.06</b>	<b>0.27</b>	<b>0.02</b>	<b>0.09</b>	<b>&lt; 0.01</b>	<b>0.02</b>	
Min – max (n = 8)	3.73- 10.25	47.58- 127.84	0.76- 1.89	25.19- 58.26	1.00- 3.64	3.54- 18.99	0.00- 0.11	0.41- 1.07	-
VC [%] <sup>c</sup>	38	43	29	29	36	57	-	26	-
2. Studie									
<b>Mittelwert</b>	<b>4.93</b>	<b>60.41</b>	<b>2.32</b>	<b>34.41</b>	<b>2.07</b>	<b>7.05</b>	<b>n. d.</b>	<b>0.75</b>	<b>n. d.</b>
$\pm$ s.d.	<b>0.21</b>	<b>0.26</b>	<b>0.14</b>	<b>0.18</b>	<b>0.08</b>	<b>0.07</b>		<b>0.03</b>	
Min – max (n = 10)	2.87- 7.92	40.53- 85.04	1.52- 3.83	22.22- 65.07	1.16- 2.90	1.70- 10.77	-	0.56- 0.93	-
VC [%]	37	22	37	36	28	44	-	19	-

a: m6Ado wurde nur in 3 Proben nachgewiesen.

b: n.d.: Nicht detektierbar.

c: Variationskoeffizient zur Beschreibung der biologischen Schwankung.

Tab. 3: Ribonucleosid-Gehalte [ $\mu\text{mol/l}$ ] in Ziegenmilch (Sammelmilch, ohne Kolostralmilch).

[ $\mu\text{mol/l}$ ]	Cyd	Urd	m1Ado	Ino	Guo	Ado	m6Ado	t6Ado	m6,2Ado
1. Studie									
<b>Mittelwert</b>	<b>8.83</b>	<b>76.27</b>	<b>0.90</b>	<b>60.64</b>	<b>2.89</b>	<b>2.40</b>	<b>n. d.<sup>a</sup></b>	<b>0.59</b>	<b>n.d.</b>
$\pm$ s.d.	<b>0.45</b>	<b>0.59</b>	<b>0.05</b>	<b>0.34</b>	<b>0.01</b>	<b>0.04</b>		<b>0.01</b>	
Min – max (n = 11)	3.89- 21.68	35.96- 114.03	0.60- 1.21	35.84- 84.88	1.99- 3.61	1.81- 3.80	-	0.34- 0.75	-
VC [%] <sup>b</sup>	57	33	17	26	17	24	-	19	-
2. Studie									
<b>Mittelwert</b>	<b>6.31</b>	<b>77.57</b>	<b>1.39</b>	<b>56.05</b>	<b>3.11</b>	<b>3.70</b>	<b>n. d.</b>	<b>0.54</b>	<b>n. d.</b>
$\pm$ s.d.	<b>0.11</b>	<b>0.18</b>	<b>0.09</b>	<b>0.22</b>	<b>0.09</b>	<b>0.07</b>		<b>0.03</b>	
Min – max (n = 10)	4.56- 10.24	58.02- 92.96	0.58- 2.55	35.00- 72.70	1.54- 3.87	1.77- 8.92	-	0.45- 0.67	-
VC [%]	26	16	42	22	21	56	-	16	

a: n.d.: Nicht detektierbar.

b: Variationskoeffizient zur Beschreibung der biologischen Schwankung.

Tab. 4: Ribonucleosid-Gehalte [ $\mu\text{mol/l}$ ] in Kamelmilch (Sammelmilch, ohne Kolostralmilch).

[ $\mu\text{mol/l}$ ]	Cyd	Urd	m1Ado	Ino	Guo	Ado	m6Ado	t6Ado	m6,2Ado
<b>Mittelwert</b>	<b>2.93</b>	<b>10.50</b>	<b>0.09</b>	<b>9.30</b>	<b>2.65</b>	<b>0.15</b>	<b>n. d.<sup>a</sup></b>	<b>0.24</b>	<b>n.d.</b>
$\pm$ s.d.	<b>0.09</b>	<b>0.19</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>0.13</b>	<b>0.04</b>	<b>0.01</b>		<b>0.01</b>	
Min – max (n= 12)	2.08- 4.58	7.83- 14.92	0.08- 0.11	7.85- 10.23	2.21- 3.37	0.09- 0.22	-	0.21- 0.26	-
VC [%] <sup>b</sup>	16	21	8	6	11	26	-	6	-

a: n.d.: Nicht detektierbar.

b: Variationskoeffizient zur Beschreibung der biologischen Schwankung.

In Kamelmilch wurden geringere Konzentrationen an Ribonucleosiden nachgewiesen als in Schaf- und Ziegenmilch [Tab. 4]. So fällt auf, dass die bestimmten Gehalte an Cyd und Urd sich in der gleichen Größenordnung befinden wie die in Kuhmilch bestimmten Gehalte. Auch in Kamelmilch wurden die modifizierten Ribonucleoside m1Ado und t6Ado nachgewiesen, hier jedoch in geringeren Konzentrationen als in Kuhmilch [16].

Prinzipiell haben die Ribonucleosidbestimmungen ergeben, dass im Vergleich zur Kuhmilch a) in den untersuchten Schaf- und Ziegenmilchproben wesentlich höhere Gehalte an unmodifizierten Ribonucleosiden gefunden wurden, insbesondere bei Ino, Cyd und Urd; und b) wurden in den untersuchten Kamelmilchproben höhere Ino- und Guo-Gehalte, bei Ado jedoch geringere Gehalte bestimmt.

Um nun die Unterschiede der Ribonucleosid-Konzentrationen und –Muster der Rohmilch von Kuh, Schaf, Ziege und Kamel darzustellen, wurden Konzentrationsverhältnisse aus den Mittelwerten (siehe Tabellen 1-4) berechnet mit dem Ziel, art-spezifische Gehaltsmuster aufzuzeigen: So konnte man z. B. bei  $C_{\text{Ino}}/C_{\text{Ado}}$  und  $C_{\text{Guo}}/C_{\text{Ado}}$  tierart-spezifische Unterschiede erkennen:  $C_{\text{Ino}}/C_{\text{Ado}}$ : 0,71 (Kuh); 4,70 und 4,88 (Schaf, 1. und 2. Studie); 25,27 und 15,15 (Ziege, 1. und 2. Studie); 62,00 (Kamel);  $C_{\text{Guo}}/C_{\text{Ado}}$ : 0,60 (Kuh); 0,23 und 0,29 (Schaf, 1. und 2. Studie); 1,20 und 0,84 (Ziege, 1. und 2. Studie); 17,67 (Kamel) [16].

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die tierart-spezifischen Ribonucleosid-Gehaltsmuster von Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Kamelmilch insbesondere anhand der unmodifizierten Ribonucleoside deutlich erkennbar sind. Eine Unterscheidung von Rohmilchproben dieser vier Tierarten ist daher durch Ribonucleosid-Gehaltsbestimmungen und der Berechnung von Konzentrationsverhältnissen möglich, wie auch statistische Auswertungen bestätigt haben [16].

Um den möglichen Einfluss einer Milchwärmebehandlung auf die Ribonucleosid-Gehalte in Milchproben zu untersuchen, wurden Rohmilchproben der genannten vier Tierarten einer Kurzzeiterhitzung unterworfen. Nach einer Kurzzeiterhitzung wurden in den Milchproben von Kuh, Schaf, Ziege und Kamel nur relativ geringe Gehaltsveränderungen bestimmt [16]. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen aus früheren umfangreichen Wärmebehandlungsversuchen von Kuhmilch [5]. Um weitere Informationen zu erhalten, sollten in Zukunft auch andere Temperatur-Zeit-Bereiche der Milcherhitzung bei der Rohmilch von Schaf, Ziege und Kamel durchgeführt werden, um einen detaillierteren Vergleich zur Kuhmilch durchführen zu können. Ein weiterer Aspekt ist die Herstellung von Trockenprodukten durch Sprühtrocknung: Hierbei sollte der Einfluss einer Sprühtrocknung auf Ribonucleosid- und Ribonucleotid-Gehalte in den genannten Milchproben untersucht werden, um wichtige Informationen für die Produktion und Zusammensetzung von maßgeschneiderten Pulverprodukten, wie z. B. Säuglingsnahrungsmittel, zu erhalten. Hier besteht noch Forschungs-

bedarf, zumal gemäß der Richtlinie 2013/46/EU [18] die Anwendung von Ziegenmilch als Proteinquelle bei der Herstellung von Säuglingsnahrungsmitteln erlaubt ist.

## Literatur:

- [1] Schlimme, E., Buchheim, W.: Milch und ihre Inhaltsstoffe. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen (1995) (*und dort zitierte Literatur*).
- [2] Voet, D., Voet, J. G.: Biochemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1994).
- [3] Beyer, H., Walter, W.: Lehrbuch der Organischen Chemie (22. Auflage). S. Hirzel Verlag, Stuttgart (1991).
- [4] Schlimme, E., Boos, K.-S.: Journal of Chromatography Library, Vol. **45c** C115-C145 (1990).
- [5] Martin, D., Kiesner, C., Schlimme, E.: Nahrung/Food **41** 258 - 267 (1997).
- [6] Martin, D., Kiesner, C., Lorenzen, P. Chr., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **50** (3) 225 - 233 (1998).
- [7] Martin, D., Lorenzen, P. Chr., Kiesner, C., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **51** (4) 343 - 355 (1999).
- [8] Martin, D., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **54** (4) 305 – 315 (2002).
- [9] Martin, D.: Ernährung/Nutrition **34** (6) 257 – 263 (2010).
- [10] Schlimme, E., Ott, F.-G., Kiesner, C.: International Dairy Journal **4** 617-627 (1994)
- [11] Martin, D., Lorenzen, P. Chr., Schrader, K.: Ernährung/Nutrition **32** (2) 56–64 (2008).
- [12] Martin, D., Lorenzen, P. Chr., Schwertfeger, M., Buchheim, W., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **53** (4) 283 – 293 (2001).
- [13] Schlimme, E., Lorenzen, P. Chr., Martin, D., Meisel, H., Thormählen, K.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **49** (2) 135 - 146 (1997).
- [14] Meisel, H., Lorenzen, P. Chr., Martin, D., Schlimme, E.: Nahrung/Food **41** (2) 75 - 80 (1997).
- [15] Andr e, S., Martin, D., Ostermeyer, U., Rehbein, H., Schw gele, F.: Fleischwirtschaft **6** 93-99 (2012).
- [16] Martin, D., Walte, H.-G., Lorenzen, P. Chr.: Small Ruminant Research **137** 162-168 (2016).
- [17] Raezke, K.-P., Schlimme, E.: Z. Naturforsch. **45 c** 655 – 662 (1990).
- [18] Richtlinie 2013/46/EU der Kommission vom 28. August 2013: Amtsblatt der Europ ischen Union L230/2016

**Vorträge**  
**zur Hochschultagung 2018**

„Landwirtschaft und Ernährung im Spannungsfeld zwischen  
Umwelt, Gesellschaft und Politik“

der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schriftenreihe der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Kiel, Heft 125, (2018)

---

**Unredigierte Informationsschrift**

Beiträge in ausschließlicher wissenschaftlicher  
und auch redaktioneller Verantwortung  
der jeweiligen Autoren

© Selbstverlag der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Schriftleitung: Prof. Dr. F. Taube  
ISSN: 0721-0809